

# Über die Gleichgewichte zwischen Eiweißkörpern und Elektrolyten.

## I. Mitteilung.

Gleichgewicht im System: Eialbumin, Ammoniumsulfat,  
Wasser.

Von

G. Galeotti.

Mit zwei Tafeln.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der K. Universität zu Neapel.)  
(Der Redaktion zugegangen am 7. April 1905.)

Als Fortsetzung meiner Arbeit<sup>1)</sup> über die chemischen Gleichgewichte, die bei den Protein- und Metallsalzlösungen auftreten, nahm ich mir vor, die Präzipitationserscheinungen der Eiweißkörper durch Neutralsalze zu untersuchen, und zwar begann ich mit dem Eialbumin und seinem Verhalten zu Ammoniumsulfat.

Der Fällungsvorgang, der in diesem Falle zustande kommt, ist vollkommen reversibel. Fügt man einer Eialbuminlösung eine ausreichende Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung hinzu, so sieht man sofort die Bildung eines Niederschlages, der sich nach Zusatz von Wasser vollkommen wieder auflöst. Filtriert man nun die Flüssigkeit, in der sich der Niederschlag gebildet hat, und setzt man zu dem klaren Filtrat eine weitere Menge von Ammoniumsulfatlösung hinzu, dann entsteht ein neuer Niederschlag, dessen Quantität von der Menge der hinzugesetzten Salzlösung abhängig ist. Wiederholt man die Filtrationen und die Zusätze von Ammoniumsulfatlösung, so kann man beliebige Mengen von Niederschlag erhalten, solange das Eialbumin sich nicht erschöpft hat.

Die Beobachtung dieser Erscheinung hat die Vorstellung erweckt, daß es sich hier um fraktionierte Fällungen handelt,

<sup>1)</sup> Über die sogenannten Metallverbindungen der Eiweißkörper nach der Theorie der chemischen Gleichgewichte. Diese Zeitschrift, Bd. XL, Heft 5 und 6.

die durch Zusatz von Ammoniumsulfat in verschiedenem Verhältnis bewirkt werden. Diese Ansicht läßt sich jedoch nicht aufrechterhalten. Aus meinen Untersuchungen ergibt sich vielmehr, daß durch diese angeblichen fraktionierten Fällungen, die Trennung von Eiweißkörpern verschiedener Natur nicht zu erreichen ist, sondern daß man nur verschiedene Mengen einer und derselben Mischung erhält.

In der vorliegenden Mitteilung werde ich die Versuchsergebnisse einer ersten Untersuchungsreihe kurz zusammenfassen. Wegen näherer Einzelheiten in bezug auf die Theorie und die verwendete Methode verweise ich den Leser auf meine eben angeführte Arbeit.

Ich verwendete kristallisiertes Eieralbumin, nach der gewöhnlichen Methode gewonnen. In diesem Falle brauchte ich selbstverständlich das unter den Kristallen und Globuliten zurückbleibende Ammoniumsulfat durch Dialyse nicht zu entfernen: dieselben wurden ohne weiteres in ganz wenig Wasser aufgelöst und die filtrierte Flüssigkeit sofort benutzt. Sämtliche Versuche wurden bei einer Temperatur von 15—16° C. ausgeführt.

Die Analyse der Lösungen fand folgendermaßen statt.

Ich brachte 5—20 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit in ein geschlossenes Gefäßchen, dann wog ich dasselbe genau, ließ das Wasser verdampfen und trocknete bei 100° C. bis zum konstanten Gewicht: hierauf nahm ich den Rückstand mit siedendem Wasser auf, filtrierte durch ein gewogenes Filter und spülte bis zum Verschwinden der Sulfate aus. Auf dem Filter blieb auf diese Weise nur das Albumin, das ich nach dem Trocknen wog. Im Filtrat bestimmte ich durch Wägung die Menge des Sulfates mit Hilfe von  $\text{BaCl}_2$ . Das Wasser wurde aus der Differenz berechnet.

Zunächst suchte ich festzustellen, ob die feste Phase, d. h. die Ablagerung von Kristallnadeln und Globuliten aus beiden Bestandteilen (nämlich aus dem Eieralbumin und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) oder aber nur aus dem Albumin allein zusammengesetzt war.

Zu diesem Zweck sammelte ich auf gewogenen Filtern verschiedene Mengen dieser kristallinen Ablagerungen, welche aus Lösungen verschiedener Konzentration gewonnen waren.

Nachdem ich durch Fließpapier den Überschuß der unter den festen Teilchen zurückgebliebenen Lösung weggesaugt hatte, wog ich die weiche teigige Masse, die ich sodann sorgfältig trocknete und nochmals wog, um die Wassermenge zu ermitteln, welche diese Masse Teig enthalten hatte. Hierauf bestimmte ich im Filtrat den Gehalt an Albumin und Ammoniumsulfat, wie ich oben beschrieben habe.

Da ich die Zusammensetzung der Lösung, mit der die feste Phase im Gleichgewicht geblieben war, durch eine eigens für diesen Zweck ausgeführte Analyse festgestellt hatte, und da ich ferner, wie eben gesagt, die Wassermenge kannte, die in der festen Phase imbibiert zurückgeblieben war, so konnte ich ohne weiteres berechnen, wieviel von dem in der festen Phase gefundenen Eiweiß und Ammoniumsulfat zu der Imbibitionsflüssigkeit gehörte: dadurch war ich in stande, die aus der Analyse der festen Phase erhaltenen Zahlen zu korrigieren.

Ich halte es für zweckmäßig, von den verschiedenen Bestimmungen, die ich ausgeführt habe, hier eine als Beispiel wiederzugeben. Die Analyse einer mit einer Ablagerung von kristallisiertem Albumin in Berührung befindlichen Lösung ergibt

$$A. \begin{cases} \text{Wasser} & 22,1711 \\ \text{Eieralbumin} & 0,6119 \\ (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 & 7,5740 \end{cases}$$

Die Analyse der Ablagerung ergab

$$B. \begin{cases} \text{Wasser} & 1,0225 \\ \text{Eieralbumin} & 0,4348 \\ (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 & 0,3498 \end{cases}$$

Berechne ich nun nach den Verhältnissen von A in bezug auf das Wasser von B (d. h. für 1,0225 g) die Menge von Eiweiß und Ammoniumsulfat, die der flüssigen Phase A zugehören und zur Imbibition von der festen Phase B dienen, so erhalte ich

$$\begin{aligned} & \text{Eieralbumin} && 0,0282 \\ & (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 && 0,3493 \end{aligned}$$

Zieht man diese Werte von jenen von B ab, so erhält man

$$\begin{aligned} & \text{Eieralbumin} && 0,4066 \\ & (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 && 0,0005 \end{aligned}$$

was beweist, daß die feste Phase bloß aus Eiweißkörpern besteht.

Zweitens muß ich erwähnen, daß aus den gesättigten Ammoniumsulfatlösungen das ganze Albumin ausgefällt wird.

Für diese Systeme kann man daher das Gleichgewicht bei Temp. 15° C. folgenderweise ohne weiteres bezeichnen:

α) Es kann ein einphasisches System, von



zusammengesetzt, entstehen.

β) Es kann ein zweiphasisches System entstehen, das aus

1. einer Lösung: Eieralbumin + H<sub>2</sub>O + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2. einem Niederschlag von Eieralbumin allein,

besteht.

γ) Es kann ein dreiphasisches System auftreten, welches aus

1. gesättigter Lösung von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> allein,

2. einem Niederschlag von Eieralbumin allein,

3. Kristallen von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> allein

besteht.

Bei Verwendung der gewöhnlichen graphischen Darstellung im Dreiecke sieht man sofort, daß für die Temp. 15° C. eine Isotherme existiert, welche den Inhalt des Dreiecks in zwei Felder trennt, das eine einphasisch (α) und das andere zweiphasisch (β). die Konjugationsgeraden des zweiphasischen Feldes verbinden die Punkte der Isotherme mit dem Gipfel des Dreiecks, der das Eieralbumin allein darstellt.

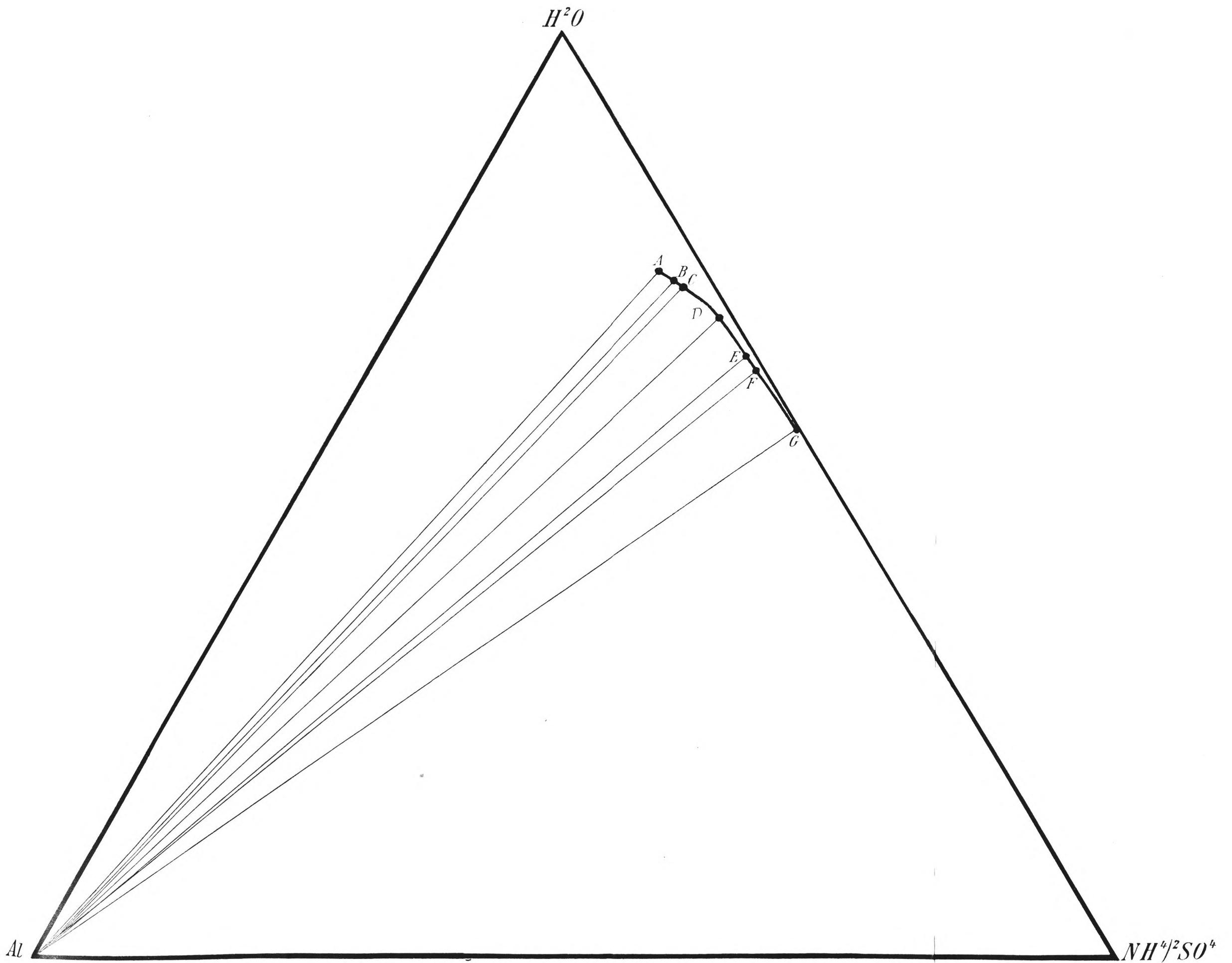
Das dreiphasische System γ wird bloß von zwei Punkten dargestellt, von denen der eine sich auf dem Gipfel befindet, der dem Eieralbumin allein entspricht, und der andere auf der (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)-Axe.<sup>1)</sup> auch diese beiden Punkte werden von einer Konjugationsgeraden verbunden.

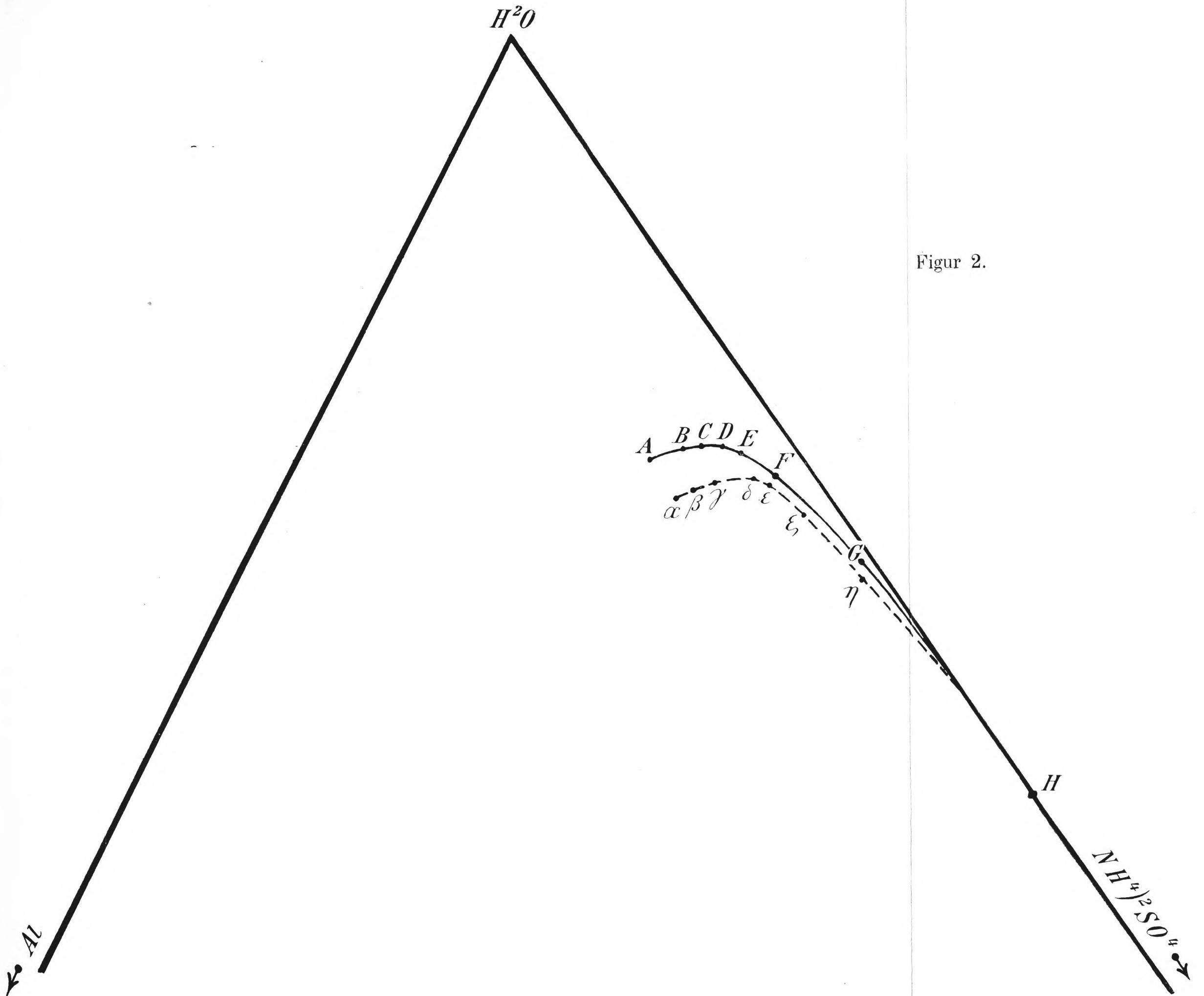
Zur Bestimmung der erwähnten Isotherme habe ich mich von zwei Methoden, der einen analytisch, der anderen synthetisch, bedient, die ich hier gesondert auseinandersetzen muß.

#### Analytisch erhaltene Isotherme. (Siehe Fig. 1.)

Das geschlagene, neutralisierte und filtrierte Eiweiß aus 15 Eiern wird mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgefällt.

<sup>1)</sup> Auch hier benutze ich die nämlichen Bezeichnungen meiner vorangehenden Arbeit.





Figur 2.

Der Niederschlag wird im Wasser wieder aufgelöst und wieder ausgefällt, dieses Verfahren zweimal wiederholt und schließlich in wenig Wasser aufgelöst, durchfiltriert und in einer großen Kristallisierschale unter einer Glasglocke und in Gegenwart von  $H_2SO_4$  belassen. Temp.  $15^\circ C$ .

Nach 7 Tagen beginnt die Bildung einer Ablagerung von Kristallen und Globuliten und nach 12 Tagen, nachdem die Ablagerung eine reichliche geworden ist, filtriere ich die Flüssigkeit und entnehme einen Teil der Lösung, um denselben der Analyse zu unterwerfen. Teil A.

Zu dem Rest des Filtrates setze ich Wasser und gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzu. Nach einer Woche filtriere ich und entnehme einen Teil davon zur Analyse. Teil B.

Dem übrigen Filtrat setze ich Wasser und gesättigte Lösung, wie oben, hinzu und entnehme nach 12 Tagen eine neue Portion. Teil C.

Dieses Verfahren wiederhole ich in gleicher Weise noch dreimal und so erhalte ich die Lösungen D, E, F, die immer geringere Mengen Eiweiß und immer größere Mengen Ammoniumsulfat enthalten.

Aus der Analyse dieser Lösungen ergeben sich die folgenden Werte:

Punkte	Ergebnisse der Analyse			Prozentige Zusammensetzung der Lösungen		
	Eieralbumin g	$H_2O$ g	Ammoniumsulfat g	Eieralbumin	$H_2O$	Ammoniumsulfat
A	0,3275	9,6266	3,0584	2,51	73,98	23,50
B	0,6119	22,1711	7,5740	2,01	73,06	24,95
C	0,1594	7,6784	2,7210	1,51	72,72	25,77
D	0,1031	24,3009	10,5030	0,29	69,62	30,09
E	0,0018	37,8252	19,9380	0,03	65,48	34,50
F	0,0103	6,3510	3,6012	0,10	63,75	36,15
G	0	7,2030	5,2562	—	57,81	42,18

Diese Isotherme (siehe Abbildung) ist keine vollständige,

weil ich bis jetzt keine an Eiweiß reicheren Lösungen erhalten konnte: man darf daher über den weiteren Verlauf der Isotherme nach links nichts behaupten. Rechts trifft sie die  $(\text{H}_2\text{O}, (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ -Axe in dem Punkte, welcher eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung darstellt. Wie ich schon erwähnt habe, existieren, wenigstens für die Temp.  $15^\circ \text{C.}$ , keine gesättigten Lösungen dieses Salzes, die Eiweiß enthalten.

Der Isothermezweig, den ich gezeichnet habe, grenzt aber schon ein einphasisches Feld von einem zweiphasischen ab. Das erstere befindet sich oberhalb derselben Kurve: alle seine Lösungen stellen Lösungen dar, die immer als solche bestehen und die niemals Eiweißfällung erzeugen. Das zweite Feld befindet sich unterhalb der Kurve: jeder Punkt von ihm stellt ein System dar, welcher früher oder später sich in zwei Phasen teilt, d. h. in Eiweiß allein und in eine Lösung, deren Zusammensetzung von dem Isothermepunkt bestimmt wird, welcher mit derjenigen Konjugationsgerade zusammenfällt, welche vom Gipfel *M.* ausgehend durch den Punkt, der das betrachtete System darstellt, passiert.

#### Synthetisch erhaltene Isothermen. (Siehe Fig. 2.)

Die in diesem Falle verwendete Methode unterscheidet sich nicht von jener auf Seite 544 meiner vorangehenden Arbeit beschriebenen.

Ich bereitete eine Lösung von (schon ausgefälltem und zu wiederholten Malen mit Ammoniumsulfat gereinigtem) Eiweiß und Ammoniumsulfat und bestimmte genau die Konzentrationen von beiden in ihr enthaltenen Stoffen. Dann verteilte ich dieselbe zu bestimmten Mengen (2 cem) in einer gewissen Zahl (60 oder 70) gut geschlossener Gefäßchen.

Dann begann ich damit, daß ich 10 solcher Gefäßchen nahm: zu jedem von ihnen fügte ich eine bestimmte Menge Wasser z. B. 0,5 cem hinzu, und dann eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung in von Gefäßchen zu Gefäßchen zunehmenden Mengen, solange in einem derselben die Bildung einer kleinen Menge Niederschlag entstand. Das betreffende Gefäßchen zeichnete ich mit *L.* aus, was bedeutet, daß die Konzentrationen der Flüssig-

keiten, die es enthielt, zu einem Punkte einer labilen Kurve zugehören; und die anderen hielt ich 24 Stunden lang auf einer konstanten Temperatur, indem ich sie wiederholt schüttelte. Nach dieser Zeitperiode konnte ich beobachten, daß in einigen derselben sich ein Niederschlag gebildet hatte, während in anderen (d. h. in denjenigen, welche eine geringere Menge Ammoniumsulfatlösung enthielten) die Flüssigkeit vollkommen klar geblieben war, und ich zeichnete das Gefäßchen, welches die geringste Menge Niederschlag enthielt, mit S aus, was bedeuten soll, daß die in ihm enthaltene Lösung die erste stabile Lösung ist, welche zu dem zweiphasischen Felde gehört.

Diese Manipulationen wiederholte ich dann mit anderen 10-Reihen von Gefäßchen, indem ich die hinzugefügte Menge von Wasser und Ammoniumsulfat variierte. Jede 10-Reihe gab mir daher einen labilen Punkt (L) und einen stabilen Punkt (S) der aufgesuchten Isothermen.

In der folgenden Tabelle sind die Daten dieser Untersuchungen wiedergegeben. Zum besseren Verständnis derselben füge ich hinzu, daß in der ersten linken Säule die Buchstaben angereiht sind, mit welchen ich die verschiedenen Gefäßchenreihen bezeichnete, die zur Bestimmung eines Punktes der stabilen Isotherme und eines Punktes der labilen Isotherme dienten. In der zweiten Säule befinden sich die Buchstaben S und L, die bedeuten, welche unter den Lösungen jeder Gefäßchenreihe den Anforderungen der stabilen und der labilen Grenzlösungen entsprechen: in der dritten die Menge Kubikzentimeter der Ammoniumsulfat enthaltenden, in jedes Gefäßchen hineingebrachten Eiweißlösung; in der vierten die Wassermenge, die für jede Gefäßchenreihe gleich und von Gefäßchenreihe zu Gefäßchenreihe verschieden war: in der fünften die Menge von Ammoniumsulfatlösungen, die von Gefäßchen zu Gefäßchen verschieden war.

Die Analyse der Eiweißlösung führte zu dem Schluß, daß sich in 1 ccm dieser Lösung

H <sub>2</sub> O	0.8619 g	
Eieralbumin	0.0554	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2018	finden.

		Eiweißlösung	Wasser	Gesättigte Ammoniumsulfat- lösung
		ccm	ccm	ccm
A	S	2	0	0
		2	0	0,05
		2	0	0,10
		2	0	0,15
		2	0	0,20
B	S	2	0,5	0,20
		2	0,5	0,30
		2	0,5	0,40
		2	0,5	0,50
		2	0,5	0,60
C	S	2	1	0,65
		2	1	0,75
		2	1	0,85
		2	1	0,95
		2	1	1,25
D	S	2	2,5	1,45
		2	2,5	1,65
		2	2,5	1,85
		2	2,5	2,15
		2	2,5	2,55
E	S	2	4	3,00
		2	4	3,20
		2	4	3,40
		2	4	3,80
		2	4	4,20
F	S	1	5	4,25
		1	5	4,50
		1	5	4,75
		1	5	5,00
		1	5	5,50
		1	5	5,50
		1	5	6,00
G	S	1	17,5	28,00
		1	17,5	28,50
		1	17,5	29,00
		1	17,5	29,50
		1	17,5	30,00
		1	17,5	30,00
		1	17,5	31,00

Die Analyse der gesättigten Ammoniumsulfatlösung ergab für 1 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  0,7203 g  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5256

An der Hand dieser Werte konnte ich die Konzentrationen der stabilen und der labilen Lösungen von allen Reihen leicht berechnen, wie es sich aus den folgenden Tabellen ergibt.

Stabile Lösungen.

Punkte	Ergebnisse der Analyse			Prozentige Zusammensetzung der Lösungen		
	Eier- albumin g	$\text{H}_2\text{O}$ g	Ammonium- sulfat g	Eier- albumin	$\text{H}_2\text{O}$	Ammonium- sulfat
A	0,1108	1,7598	0,4299	4,81	76,50	18,69
B	0,1108	2,5119	0,6138	3,42	77,61	18,96
C	0,1108	3,2641	0,7978	2,65	78,23	19,12
D	0,1108	5,5564	1,3760	1,57	78,88	19,53
E	0,1108	8,1725	2,1907	1,05	78,02	20,91
F	0,0554	9,4634	2,8298	0,45	76,63	22,91
G	0,0554	39,6619	15,7438	0,10	71,51	28,39
H	0	7,2030	5,2562	—	57,81	42,18

Labile Lösungen.

Punkte	Ergebnisse der Analyse			Prozentige Zusammensetzung der Lösungen		
	Eier- albumin g	$\text{H}_2\text{O}$ g	Ammonium- sulfat g	Eier- albumin	$\text{H}_2\text{O}$	Ammonium- sulfat
$\alpha$	0,1108	1,8678	0,5087	4,45	75,10	20,45
$\beta$	0,1108	2,6560	0,7190	3,18	76,19	20,62
$\gamma$	0,1108	3,4441	0,9292	2,47	76,80	20,72
$\delta$	0,1108	6,0606	1,7439	1,40	76,57	22,03
$\epsilon$	0,1108	8,7492	2,6112	0,96	76,27	22,77
$\zeta$	0,0554	10,1837	3,3554	0,40	74,92	24,68
$\eta$	0,0554	40,6929	16,4948	0,09	71,09	28,82
H	0	7,2030	5,2562	—	57,81	42,18

Es ist zu bemerken, daß diese Zahlenwerte nur annähernde sind, zunächst wegen der angewendeten volumetrischen

Methode anhaltenden Ungenauigkeiten und zweitens, weil zur Bestimmung der stabilen Isothermen Lösungen verwendet werden, die dem einphasischen Feld sehr nahe liegen, die jedoch zu dem zweiphasischen Feld gehören, da sich in ihnen schon etwas Niederschlag gebildet hat. Und so werden zur Bestimmung der labilen Isothermen Lösungen verwendet, die den wirklich labilen Lösungen (die nämlich eine gewisse Zeit brauchen, um sich in den beiden Phasen zu trennen) sehr nahe liegen, welche aber schon etwas Niederschlag unmittelbar liefern.

In Fig. 2 werden die mit diesen Werten enthaltenen Isothermen dargestellt. Die labile Isotherme unterscheidet sich nicht in ihrer Gestalt von jener mit der analytischen Methode gewonnenen, nur erstreckt sie sich mehr nach links, indem sie sich etwas abwärts biegt.

Die labile Kurve folgt dem Verlauf der stabilen. Beide begrenzen ein Labilitätsfeld, dessen Punkte Systemen entsprechen, die eine mehr oder minder lange Zeit hindurch als klare Lösungen bestehen, um dann einen Niederschlag zu geben. Unterhalb der labilen Kurve entsprechen die Punkte des Dreieckes Systemen, welche unmittelbar einen Niederschlag erzeugen.

Dieses Labilitätsfeld hat die Gestalt eines eingebogenen Keiles, er ist breiter gegen die Mitte des Dreieckes zu, während es sich nach rechts zu sehr verschmälert, wo die beiden Isothermen sich dem Zusammenfallen nähern. Dies bedeutet, daß um so leichter labile Systeme zu erhalten sind, je mehr Eiweiß und je weniger Ammoniumsulfat vorhanden ist. Seltener ist hingegen die Labilität bei den an Eiweiß armen und an Ammoniumsulfat reichen Systemen. Man kann ferner schließen, daß das Gleichgewicht viel rascher zustande kommt, wenn die Menge Ammoniumsulfat reichlich vorhanden ist, als wenn zu einer an Eiweiß reichen Lösung nur geringfügige Mengen dieses Salzes hinzugefügt werden.

### Schlüsse.

1. Die Fällung des Eieralbumins durch das Ammoniumsulfat stellt einen reversiblen Vorgang dar. In einer Eieralbuminlösung beginnt die Fällung, wenn die Konzentration des Salzes einen gewissen Grenzwert erreicht hat, und von

diesem an fallen weitere Mengen derselben Proteinsubstanz durch Zusatz neuer Salzmengen aus. Fügt man Wasser hinzu, so lösen sich die Niederschläge vollständig wieder auf. Ist die Lösung mit Ammoniumsulfat vollkommen gesättigt, dann bleibt kein Eieralbumin mehr darin gelöst.

2. Sowohl der Niederschlag, der durch Mischung einer Eieralbuminlösung mit einer genügend konzentrierten Ammoniumsulfatlösung entsteht, wie die Ablagerungen von kristallinen Nadeln und Globuliten, die aus einer klaren Lösung langsam durch Abdampfung sich bilden, bestehen nur aus einer einzigen Art von Eieralbumin.

3. Die Lösungen, die mit einer festen Phase von Albumin in Gleichgewicht stehen, werden von den Punkten einer Isotherme dargestellt, welche in bezug auf das Feld, in welchem sie sich erstreckt, und in bezug auf die Temperatur von  $15^{\circ}$  C. das Problem des Gleichgewichtes dieser Systeme graphisch löst, insofern man für irgend ein gegebenes System durch Betrachtung des Punktes, welcher dasselbe im Dreiecke darstellt, sofort bestimmen kann, ob es aus einer Lösung besteht, welche als solche zurückbleiben wird, oder aber ob es sich in zwei Phasen trennen wird, d. h. in Albumin und in einer Lösung, deren Konzentrationen man sofort wird ermitteln können, indem man die Konjugationsgrade in Betracht zieht, welche durch den betrachteten Punkt passiert.

4. Mischt man eine Eieralbuminlösung mit einer genügend konzentrierten Ammoniumsulfatlösung, so entsteht mitunter ein Niederschlag erst nach einer gewissen Zeit, d. h. es gibt labile Systeme, welche eine gewisse Zeit hindurch als klare Lösungen bestehen, und dann trennen sie sich in zwei Phasen, die eine feste und die andere flüssige. Mir gelang es, das Feld dieser labilen Systeme durch zwei Isothermen zu begrenzen, und so kann man für jedes System durch Betrachtung des dasselbe darstellenden Punktes ohne weiteres feststellen, ob in demselben System ein Niederschlag sofort oder nach einer gewissen Zeit auftritt, oder aber derselbe darin überhaupt nicht entstehen und die Lösung endgiltig unverändert bestehen bleibt.